

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-238959

(43)公開日 平成5年(1993)9月17日

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|-----------|-----|--------|
| A 6 1 K 47/48 | | Z 7433-4C | | |
| 9/06 | | F 7329-4C | | |
| 33/24 | ADU | 8314-4C | | |
| 45/00 | | 8415-4C | | |

審査請求 未請求 請求項の数2(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-79220

(22)出願日 平成4年(1992)2月28日

(71)出願人 000191766

森下ルセル株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目3番8号

(71)出願人 000141510

株式会社紀文フードケミファ

東京都港区新橋3丁目2番5号

(72)発明者 白石 澄廣

滋賀県大津市瀬田橋本町200番地24号

(72)発明者 松田 光子

滋賀県甲賀郡甲西町下田1843番地57号

(72)発明者 中野 泰治

滋賀県草津市野路町1444番地2号

(72)発明者 小田切 優樹

熊本県熊本市長嶺町1675の32

(54)【発明の名称】 静脈注射用制癌作用物質複合体

(57)【要約】

【目的】 従来の制癌作用物質の高分子プロドラッグに見られた問題点を解決し、副作用の少ない、また生物学的有用性に優れた静脈注射用制癌剤複合体を提供する。

【構成】 アルギン酸またはその塩のカルボキシル基に制癌作用物質が結合してなる静脈注射用制癌剤複合体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルギン酸またはその塩のカルボキシル基に抗癌作用物質が結合してなる静脈注射用抗癌剤複合体。

【請求項2】 抗癌作用物質が白金錯体化合物である請求項1記載の静脈注射用抗癌剤複合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、高分子プロドラッグ化による静脈注射用抗癌剤複合体に関し、さらに詳しくは、アルギン酸またはその塩に抗癌作用物質が結合してなる静脈注射用抗癌剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、多数の抗癌作用物質が開発され、臨床に用いられている。しかし、多くの抗癌作用物質は、癌細胞と正常細胞の感受性に対して十分な特異性を示さないため、正常細胞に対しても作用し、副作用が大きい。そこで、抗癌作用物質を癌細胞へ選択的に、かつ望ましい量を長時間にわたって供給できるターゲティング療法について、種々の製剤的工夫が提案されている。

【0003】 例えば、癌細胞へ特異的に抗癌作用物質を到達させるために、癌細胞に対して親和性を有する高分子物質に抗癌作用物質を結合させた高分子プロドラッグが提案されている。高分子プロドラッグに使用される高分子物質（以下担体という）としては、デキストラン等の多糖類（Int.J.Pharmaceut.Vol.137,145-154,1987）、アルブミン等の蛋白、ペプチド類（Proc,Natl.Acad.Sci.USA.Vol.81,1445-1447,1984）およびポリエチレングリコール等の合成高分子（J.Pharmacol.Exp.Theor.Vol.216,410-414,1981）が知られている。

【0004】 ところが、ペプチド類および合成高分子を担体とした場合、担体自身の毒性が問題となる。また、デキストランを担体とした場合は、デキストランが、抗癌作用物質を結合させる官能基をもたない中性多糖類であることから、抗癌作用物質の結合にはスパーサーが必要で、製造工程が複雑になる点およびスパーサー自身の毒性が問題となる。このデキストランを担体とした場合の問題点を解決する方法として、デキストランのアルドヘキソピラノース環を酸化剤で開裂し、得られた酸化デキストランに抗癌剤を結合させる方法が開示されている（特開昭63-264427号公報）。しかし、前記の酸化デキストランに抗癌剤を結合させた抗癌剤複合体を静脈注射剤として用いるためには、デキストランの開裂に用いた酸化剤（例えば過ヨウ素酸ナトリウム）を透析して取り除く必要があり、大量生産が困難な問題がある。

【0005】 ターゲティング療法に利用されている抗癌剤として、高分子プロドラッグの他に抗体-抗癌作用物質複合体が提案されている。これは、癌に対する標的指

向物質として抗体を利用したもので、例えば、特開昭62-221637号公報には抗癌作用物質と抗体を結合させるためのスパーサーとしてアルギン酸を利用する方法が開示されている。これは、アルギン酸を酸化剤で酸化して生じたアルデヒド基に、抗癌作用物質を結合させるもので、酸化デキストランを用いた高分子プロドラッグと同様な問題点を含んでいる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 したがって、本発明の課題は、従来の抗癌作用物質の高分子プロドラッグに見られた問題点を解決し、副作用の少ない、また生物学的有用性に優れた静脈注射用抗癌剤複合体を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、鋭意検討した結果、アルギン酸またはその塩のカルボキシル基に抗癌作用物質を結合させた静脈注射用抗癌剤複合体が上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成することができた。すなわち、本発明は、アルギン酸またはその塩のカルボキシル基に抗癌作用物質が結合してなる静脈注射用抗癌剤複合体を提供するものであり、好ましい実施態様として、抗癌作用物質が白金錯体化合物である静脈注射用抗癌剤複合体を挙げることができる。

【0008】 本発明に係るアルギン酸またはその塩は、水に対する溶解度が高い、毒性が少ない、体内蓄積性がない、免疫原性がない、薬剤を結合するための官能基を有している、さらに至適な分子サイズが選択できるなど、担体として要求される諸性質を備えている。なかでも、アルギン酸の塩としてはアルカリ金属塩が好ましい。アルギン酸またはその塩の好ましい平均分子量の範囲は1,000~100,000、さらに好ましくは5,000~80,000である。アルギン酸またはその塩と抗癌作用物質の結合割合に関しては、アルギン酸またはその塩のカルボキシル基のうち、5~100%が抗癌作用物質と結合していることが好ましい。

【0009】 抗癌作用物質としては、カルボキシル基と結合できるものであればよく、また、結合できないものについては、適当な化合物を反応させてカルボキシル基と反応性の官能基を導入すればよい。特に、アルギン酸またはその塩は2価以上の金属と容易に錯体を形成するため、抗癌作用物質としては、金属錯体化合物が好ましい。金属錯体化合物のなかでも白金錯体化合物は、腎臓に対する副作用および嘔吐等の副作用が頻発していることから、特にターゲティング療法が望まれている抗癌作用物質であり、本発明の静脈注射用抗癌剤複合体として好適に使用できる。

【0010】 アルギン酸またはその塩と抗癌作用物質との反応は、アルギン酸またはその塩200mgに対して抗癌作用物質0.1ミリモル~1ミリモル、例えば、シスプラチンとして30mgから300mg程度を反応さ

せることが好ましい。

【0011】前記反応は、例えば、水またはアルカリ水溶液を溶媒として用いアルギン酸またはその塩を約0.1~2W/V%、シスプラチンを0.015~3W/V%となるように加えて、室温で12~72時間攪拌させることによって行う。前記反応により得られた制癌剤複合体水溶液は、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィーなどの方法で精製することができる。精製した制癌剤複合体水溶液は、注射用蒸留水で希釈し、等張化剤、pH調整剤等の添加剤を加えた後滅菌して経静脈用の注射剤とする。また、前記静脈注射用制癌剤複合体水溶液を凍結乾燥製剤とすることもできる。

【0012】

【実施例】

実施例1

平均分子量9,600のアルギン酸ナトリウム（紀文フードケミファ社製）266mg（ウロン酸単位（ウロン酸ナトリウム単位）として 1.33×10^{-3} モル）を蒸留水40mlに溶解し、シスプラチン（シグマ社製）40mg（ 1.33×10^{-4} モル）を加えて、室温で72時間振とうした。この反応液を、分画分子量2,000の透析用チューブ（フナコシ社製）に入れ48時間透析して、遊離シスプラチンを除き、この溶液に塩化ナトリウムを加え等張とした後、ろ過滅菌してシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体（シスプラチンとアルギン酸ナトリウムの比率1:11）の経静脈用注射剤（白金として0.6mg/ml）を得た。なお、前記反応液中のシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体の生成率を、遊離シスプラチン量の測定により求めた結果、91%であった。遊離シスプラチン量の測定は、反応液中の遊離シスプラチンを平衡型透析セル（孔径24オングストロームのセルロース膜使用、京都理化社製）で分離後、発色試薬o-フェニレンジアミン（OPDA）を用いた吸光度測定法により行った。

【0013】実施例2

平均分子量9,600のアルギン酸ナトリウム（紀文フードケミファ社製）106mg（ウロン酸単位（ウロン酸ナトリウム単位）として 0.53×10^{-3} モル）および160mg（ウロン酸単位（ウロン酸ナトリウム単位）として 0.80×10^{-3} モル）をそれぞれ蒸留水40mlに溶解し、各溶液にシスプラチン（シグマ社製）40mg（ 1.33×10^{-4} モル）を加え室温で72時間振とうした。以降、実施例1と同様に処理して、シスプラチンとアルギン酸ナトリウムの比率がそれぞれ1:4.4および1:6.7のシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体の経静脈用注射剤を得た。なお、前記反応液中のシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体の生成率は2種類の反応液ともに90%であった。

【0014】実施例3

平均分子量14,000、45,500、74,000の3種類のアルギン酸ナトリウム（紀文フードケミファ社製）各266mg（ウロン酸単位（ウロン酸ナトリウム単位）として 1.33×10^{-3} モル）をそれぞれ蒸留水40mlに溶解した後、各溶液にシスプラチン（シグマ社製）40mg（ 1.33×10^{-4} モル）を加えて、室温で72時間振とうした。以降、実施例1と同様に処理して、アルギン酸ナトリウム分子量の異なったシスプラチン-アルギン酸複合体の経静脈用注射剤を得た。なお、前記3種類の反応液中のシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体の生成率は90~92%であった。

【0015】試験例1

実施例1で調製した反応溶液、シスプラチン（シグマ社製）水溶液（1mg/ml）およびアルギン酸ナトリウム水溶液（13mg/ml）のそれぞれ1mlをゲルろ過用カラム（セファデックスG-50、カラム；内径1.5cm×22cm、流速2ml/5min.）に注入し、分画分取した。分画分取した前記反応溶液およびシスプラチン水溶液は、OPDAで発色させ波長703nmにおける吸光度を測定した。また、分画分取したアルギン酸ナトリウム水溶液は波長205nmにおける吸光度を測定した。図1にそれぞれのゲルクロマトグラムを示す。反応溶液のクロマトグラムとアルギン酸ナトリウム水溶液のそれとがほとんど一致したことから、反応液中でシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体が形成されていることが明らかとなった。

【0016】試験例2

実施例1で調製したシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体の経静脈用注射剤およびシスプラチン（シグマ社製）水溶液（1mg/ml）を、それぞれSD系雄性ラット（7週齢、1群4匹）に静脈内投与し（投与量：白金として1.3mg/kg相当量）、ヘパリン処理したヘマトクリット管を用いて経時的に尾静脈より採血した。各血液試料を遠心分離後、血漿中の白金量を原子吸光光度計（180-80型、日立製作所製）を用いて測定した。

【0017】前記2種類の被検物質の白金血中濃度-時間推移を図2に、また、投与後24時間までの血漿中白金濃度-時間曲線下面積（AUC₀₋₂₄）を表1にそれぞれ示した。シスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体投与群は、シスプラチン投与群に比べ投与後の各時間における白金の血漿中濃度が高く、また、シスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体のAUC₀₋₂₄は、シスプラチン投与群の約3倍であった。これらの結果より、本発明のシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体が、体内貯留性に優れた生物学的有用性をもつことが明らかとなった。

【0018】

【表1】

シスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体およびシスプラチン
投与後の血漿中白金濃度-時間曲線下面積

| | AUC ₀₋₂₄ (hr·μg/ml) |
|----------------------|-----------------------------------|
| シスプラチン | 7.83 ± 0.72 |
| シスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体 | 23.76 ± 1.15 |

各値は n=4 の平均値 ± S.E. を示す。

【0019】試験例3

実施例1で調製したシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複体の経静脈用注射剤およびシスプラチン（シグマ社製）水溶液（1 mg/ml）を、それぞれSD系雄性ラット（7週齢，1群4匹）に静脈内投与し（投与量：白金として1.3 mg/kg相当量）、24時間後に腎臓を摘出して、腎臓中の白金量を原子吸光度計（180-80型、日立製作所製）を用いて測定した。*

*表2に腎臓中の白金量測定結果を示す。シスプラチン-アルギン酸複合体投与群の腎臓中の白金量は、シスプラチン投与群の1/2以下であり、本発明の静脈注射用制癌剤複合体は腎臓への蓄積性が少ないことが明らかとなった。

【0020】

【表2】

シスプラチンおよびシスプラチン-アルギン酸ナトリウム
複合体投与後の24時間後の腎臓中白金濃度

| | 白金濃度 (mg/wet g) |
|----------------------|--------------------|
| シスプラチン | 14.37 ± 2.58 |
| シスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体 | 6.05 ± 3.47 |

各値は n=4 の平均値 ± S.E. を示す。

【0021】試験例4

実施例1および実施例2で調製した2種類のシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複体の経静脈用注射剤およびシスプラチン（シグマ社製）水溶液（1 mg/ml）を、それぞれSD系雄性ラット（7週齢，1群5～14匹）に静脈内投与（白金として2.6 mg/kg）した。また、対照群として、生理食塩水およびアルギン酸ナトリウム水溶液（6.65 mg/ml）をそれぞれ投与（4 ml/kg）した。投与後4日目に腹部大静脈より採血して、血清中の尿素窒素（以下BUNという）とクレアチニン（以下CREという）を自動分析装置（7

150型、日立製作所製）で測定した。

【0022】表3に各被検物質投与群のBUN，CREを示す。シスプラチン投与群のBUN，CREはそれぞれ対照群の6.4倍、4.7倍と高値を示した。一方、シスプラチンとアルギン酸ナトリウムの比率が異なる3種類のシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体投与群のBUNは、いずれも対照群の2.4～2.7倍、またCREは2.2～2.4倍とシスプラチン投与群より低く、腎障害が少ないことが明らかとなった。

40 【0023】

【表3】

シスプラチンおよびシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体投与
後4日目の血清中尿素窒素 (BUN) とクレアチニン (CRE) の値

| | BUN (mg/dl) | CRE (mg/dl) |
|-------------------------------|----------------|----------------|
| 生理食塩水 | 18.99 ± 0.46 | 0.53 ± 0.01 |
| アルギン酸ナトリウム | 18.59 ± 0.93 | 0.49 ± 0.02 |
| シスプラチン | 121.91 ± 25.66 | 2.49 ± 0.39 |
| シスプラチン-アルギン酸ナトリウム (1:4.4) 複合体 | 45.05 ± 2.03 | 1.27 ± 0.09 |
| シスプラチン-アルギン酸ナトリウム (1:6.7) 複合体 | 50.26 ± 4.82 | 1.35 ± 0.10 |
| シスプラチン-アルギン酸ナトリウム (1:11) 複合体 | 51.03 ± 4.62 | 1.17 ± 0.14 |

各値は平均値 ± S. E. を示す。

【0024】試験例5

実施例1および実施例2で調製した2種類のシスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体の経静脈用注射剤およびシスプラチン (シグマ社製) 水溶液 (1 mg/ml) のAH109A細胞に対する増殖阻害効果を調べた。AH109A細胞は、牛胎仔血清を10%添加したRPMI 1640培地 (GIBCO社製) を用いて5%二酸化炭素ガス雰囲気中、37℃条件下で培養した。1×10⁴細胞/mlのAH109A細胞を浮遊させた培地10 mlを、シャーレに入れ3日間前培養した。新鮮培地9 mlを培地交換したシャーレに、白金として1、2、4、6 μg/mlになるように希釈した被検試料溶液1 mlを加え2日間培養した。培養前と培養終了時のAH*

20×109A腫瘍細胞数を、0.02% EDTA含有のダルベッコPBS (一) 溶液 (ニッスイ社製) で処理した後、自動血小板計数装置 (PL-110型、東亜医用電子社製) を用いて測定した。

【0025】シスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体およびシスプラチンの50%腫瘍細胞阻止濃度 (以下IC₅₀という) を、腫瘍細胞抑制率曲線より求め表4に示した。シスプラチン-アルギン酸複合体のIC₅₀は、いずれもシスプラチンとほぼ等しい値を示し、本発明の静脈注射用制癌剤複合体がシスプラチン固有の抗腫瘍活性を保持していることが明らかとなった。

【0026】

【表4】

シスプラチン-アルギン酸ナトリウム複合体のAH109A腫瘍細胞の増殖阻止効果

| | IC ₅₀ (μg/ml) |
|-------------------------------|-----------------------------|
| シスプラチン | 0.130 |
| シスプラチン-アルギン酸ナトリウム (1:4.4) 複合体 | 0.186 |
| シスプラチン-アルギン酸ナトリウム (1:6.7) 複合体 | 0.181 |
| シスプラチン-アルギン酸ナトリウム (1:11) 複合体 | 0.162 |

【0027】

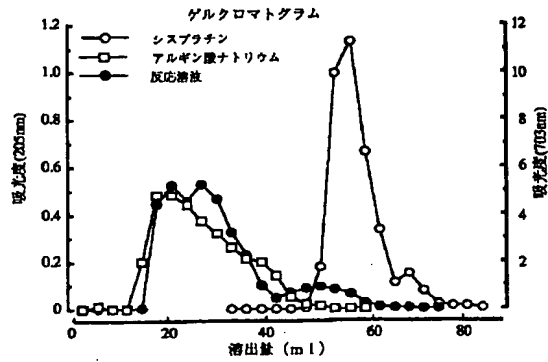
【発明の効果】本発明の静脈注射用制癌剤複合体は制癌作用物質単独に比べ生物学的有用性に優れ、かつ正常臓器への移行性が少ない。したがって、制癌作用物質固有の制癌活性を失うことなく、副作用を軽減することがで

き、癌の化学療法に有用な制癌剤を提供できる。さらに、本発明の静脈注射用制癌剤複合体は、室温で特殊な反応を使うことなく効率よく製造できるので、工業的な生産が可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 アルギン酸ナトリウムとシスプラチンとの反応
溶液、シスプラチン水溶液およびアルギン酸ナトリウム

【図1】



水溶液のゲルクロマトグラムを示す。

【図2】 本発明の効果をあらわす説明図

【図2】

